

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAÍS FERNANDES MENDONÇA MOTA

**BIOMONITORAMENTO UTILIZANDO ENSAIO COMETA EM PEIXES:
AVALIAÇÃO CIENCIOMÉTRICA**

PARANAVAI

2014

THAÍS FERNANDES MENDONÇA MOTA

**BIOMONITORAMENTO UTILIZANDO ENSAIO COMETA EM PEIXES:
AVALIAÇÃO CIENCIOMÉTRICA**

Monografia apresentada como requisito parcial à conclusão do Curso de Especialização em Genética para Professores do Ensino Médio, na modalidade de Ensino a Distância, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Margarete Cestari

PARANAVAÍ

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as graças e por todos os momentos de minha vida.

Agradeço a minha família, Claudio, Giovana e Gabriele, pelo amor, incentivo, apoio e compreensão.

Agradeço a meus pais, Santo e Rosa, por todo apoio e amor, e as minhas irmãs Viviane e Ana Maria, por toda ajuda, troca de experiências, amizade e amor.

Agradeço a Universidade Federal do Paraná e ao Curso de Especialização em Genética para Professores do Ensino Médio pela oportunidade.

Agradeço aos professores e as tutoras pela atenção.

Agradeço a professora Dra. Marta Margarete Cestari pela orientação.

Agradeço aos meus amigos, em especial à Nédia, por me ensinar sobre a técnica do ensaio cometa e suas aplicações.

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os ecossistemas aquáticos acabam sendo o depósito final da maioria dos poluentes, seja por lançamento direto ou indireto, e a poluição ambiental pode comprometer a biodiversidade. Desta forma, o biomonitoramento é uma ferramenta útil para avaliar a saúde dos ecossistemas. Entre as abordagens utilizadas, a técnica do ensaio cometa mostrou-se eficiente na detecção de substâncias genotóxicas em organismos aquáticos e adequada para avaliações de biomonitoramento. Os peixes têm sido amplamente utilizados em programas de biomonitoramento e são considerados mais adequados porque sofrem bioacumulação e respondem a agentes mutagênicos mesmo em baixas concentrações. Diante disso, o objetivo deste trabalho é avaliar o desenvolvimento do conhecimento sobre biomonitoramento utilizando o ensaio cometa em peixes. O levantamento bibliométrico foi realizado utilizando a base de dados *ISI Web of Knowledge*. Foram selecionados 40 artigos. A primeira publicação é de 1998 e no ano de 2010, 22,5 % dos artigos foram publicados. O gênero *Oreochromis* foi estudado em três artigos e os gêneros *Astyanax*, *Conger*, *Cyprinus*, *Limanda*, *Prochilodus* e *Solea* foram estudados em dois trabalhos cada um. O ensaio cometa foi utilizado por 20% dos artigos para avaliar a genotoxicidade de água poluídas. Foram avaliados os efeitos genotóxicos de efluente de estação de tratamento em três trabalhos. Considerando os artigos selecionados, 27,5% utilizam exclusivamente o ensaio cometa nas análises, muitos trabalhos combinaram o ensaio cometa e o teste de micronúcleo. Vários países publicaram sobre o assunto, e houve parcerias entre diferentes países em 30% dos trabalhos. Os artigos foram publicados em 29 diferentes revistas. Foi possível observar que o ensaio cometa muitas vezes é utilizado com outras técnicas para aumentar a eficiência da avaliação sobre determinados genotóxicos e que além de avaliar a poluição ambiental, vários outros compostos podem ser utilizados em testes de genotoxicidade por meio do ensaio cometa.

Palavras-chave: Genotoxicidade 1. Biomarcadores 2. Poluição ambiental 3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 – Número de artigos sobre biomonitoramento utilizando o ensaio cometa em peixes.....	11
Gráfico 2 – Tipos de biomarcadores utilizados nos artigos sobre biomonitoramento utilizando o ensaio cometa em peixes.....	14
Gráfico 3 – Número de artigos sobre biomonitoramento utilizando o ensaio cometa em peixes em relação ao país de filiação dos autores.....	15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gêneros mais estudados nos artigos selecionados sobre biomonitoramento utilizando o ensaio cometa em peixes.....	12
Tabela 2 - Diferentes espécies estudadas em um mesmo artigo.....	13
Tabela 3 - Genotóxicos que foram avaliados nos artigos selecionados e autor e ano de publicação.....	13
Tabela 4 - Revistas com a quantidade de artigos publicados sobre biomonitoramento utilizando o ensaio cometa em peixes.....	16

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	08
1.1	JUSTIFICATIVA.....	09
1.2	OBJETIVOS	9
2	METODOLOGIA.....	10
3	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	10
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	17
	REFERÊNCIAS.....	18

1 INTRODUÇÃO

Os processos de urbanização, industrialização e o crescimento populacional acelerado têm contribuído para o aumento da poluição nos ecossistemas. Os rios e lagos próximo a locais mais urbanizados são constantemente afetados por descargas de efluentes rurais, industriais e domésticos (GRIMM et al., 2008). Estes descartes derivados apresentam uma mistura complexa de substâncias tóxicas, com vários contaminantes, representando uma ameaça tanto para ecossistemas aquáticos quanto para a saúde das populações humanas (POLLACK et al., 2003).

Entre as alterações bioquímicas causadas nos organismos, destaca-se o potencial genotóxico de vários poluentes. Agentes genotóxicos são capazes de afetar a reprodução, vida embrionária, desenvolvimento, crescimento e podem ter relação com a carcinogênese, teratogênese e patologias de fundo genético (LEE; STEINERT, 2003), uma vez que são capazes de alterar as informações codificadas no DNA. A genotoxicidade ocorre quando, alterações na estrutura ou no conteúdo dos cromossomos ou na sequência de pares de bases do DNA, são causadas devido à exposição a um agente tóxico (MCGREGOR, 2000).

Os efeitos de muitos poluentes podem ser analisados diretamente em vários organismos, geralmente através de células, tecidos ou órgãos (PADRANGI et al., 1995). Desta forma, o biomonitoramento pode ser definido como o uso sistemático das respostas dos organismos vivos para avaliar e monitorar as mudanças ocorridas no ambiente (MATTHEWS et al., 1982), sendo o mais indicado para detectar o nível de comprometimento da vida aquática e analisar o nível de degradação ambiental (MORENO; CALLISTO, 2005). Os peixes têm sido amplamente utilizados em programas de biomonitoramento e são considerados mais adequados porque sofrem bioacumulação, respondem a agentes mutagênicos mesmo em baixas concentrações, e, além disso, são os principais vetores de transferência de contaminantes para os humanos (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Em testes de genotoxicidade e biomonitoramento o ensaio cometa é amplamente utilizado para avaliar danos e reparo no DNA, por ser uma ferramenta simples, versátil, visual, rápida e sensível (OLIVE; BANÁTH, 2006). O princípio básico deste teste é o da lise de membranas celulares, seguida pela indução de migração eletroforética de DNA liberado em matriz de agarose. Após coloração, as preparações são vistas em microscópio, o DNA danificado de uma célula individual

revela-se como uma forma similar a de um cometa, a cauda corresponde aos fragmentos do material genético (COLLINS et al., 2008).

A preocupação com o monitoramento da produção científica cresceu nos últimos anos. Existem diferentes meios de avaliar a ciência, tanto quantitativamente como qualitativamente. A cienciometria é uma forma quantitativa de avaliar as atividades científicas, relacionadas à produção, propagação e utilização destas informações por determinado país, instituição e comunidade interessada (SPINAK, 1998).

1.1 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, a preocupação com questões ambientais tem aumentado significativamente. Está crescendo o interesse da comunidade científica e de agências regulatórias em relação à detecção, conhecimento e controle de agentes ambientais que provocam danos a saúde humana e a sustentabilidade dos ecossistemas (SILVA et al., 2003).

Os ecossistemas aquáticos acabam sendo o depósito final da maioria dos poluentes que são despejados no ecossistemas, seja por lançamento direto ou indireto. A poluição ambiental aquática pode comprometer a biodiversidade. Desta forma, o biomonitoramento é uma ferramenta útil para avaliar a saúde dos ecossistemas. A técnica do ensaio cometa mostrou-se eficiente na detecção de substâncias genotóxicas em organismos aquáticos e adequada para avaliações de biomonitoramento.

Considerando a necessidade de biomonitoramento ambiental e a ampla utilização da técnica de ensaio cometa para avaliar danos e reparos ao DNA de organismos expostos a genotóxicos, a avaliação do desenvolvimento do conhecimento sobre biomonitoramento utilizando o ensaio cometa em peixes pode indicar o estado atual do conhecimento e fornecer informações sobre quais áreas priorizar em estudos posteriores.

1.2 OBJETIVO

Avaliar o desenvolvimento do conhecimento sobre biomonitoramento utilizando o ensaio cometa em peixes.

2 METODOLOGIA

A busca por textos científicos foi realizada na base de dados *ISI Web of Knowledge*, devido a sua abrangência quanto ao número de publicações e qualidade das revistas indexadas. As palavras-chave utilizadas foram “*Biomonitoring and Fish and Comet assay*” para selecionar os artigos com assuntos interligados. Não foi delimitando o período específico, pois foram contabilizados todos os trabalhos encontrados até abril de 2014. A quantidade de vezes que o artigo foi citado também está disponível neste banco de dados. Foram selecionadas as publicações que apresentavam as seguintes informações: (I) biomonitoramento utilizando ensaio cometa (II) ano de publicação; (III) espécie estudada; (IV) técnicas utilizadas em conjunto (V) poluente avaliado (VI) autores; (VII) países onde estão filiados os autores; (VIII) número de vezes que o artigo foi citado; (IX) periódico em que o artigo foi publicado. Através da coleta destas informações foi elaborado um conjunto de dados.

3 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

A importância na identificação de riscos genotóxicos associados com a poluição da água começou a ser observada no final dos anos 70, no momento em que novas técnicas foram desenvolvidas para monitorar no ambiente aquático a presença de produtos danosos ao DNA (JHA, 2008). A técnica de ensaio cometa foi desenvolvida por OSTLING e JOHANSON (1984), e permitia identificar quebras de fita dupla no DNA. SINGH et al. (1988), desenvolveram uma variação da técnica, onde foi possível detectar no DNA as quebras em fita simples. SPEIT e HARTMANN (1995) desenvolveram a técnica do ensaio cometa em eritrócitos de peixes, que sofreu modificação por FERRARO et al. (2004) e CESTARI et al. (2004). Posteriormente RAMSDORF et al. (2009) modificou a técnica para a realização do ensaio cometa em células de tecido hepático. Nos últimos anos, vários estudos foram realizados utilizando esta técnica. De acordo com os critérios utilizados foram

selecionados 40 artigos, destes três são revisão de literatura. A primeira publicação é de 1998 e no ano de 2010, 22,5 % dos artigos foram publicados (gráfico 1).

Nos trabalhos várias espécies foram utilizadas, o gênero *Oreochromis* foi estudado em três artigos e os gêneros *Astyanax*, *Conger*, *Cyprinus*, *Limanda*, *Prochilodus* e *Solea* foram estudados em dois trabalhos cada um. A maioria dos artigos utilizou apenas uma espécie nas análises (tabela 1). Várias espécies foram comparadas em um estudo de um lago eutrofizado devido ao inaquado tratamento de esgoto. Entre as sete espécies analisadas, *Steindachnerina insculpta* foi a que apresentou mais danos ao DNA, seguida de *Cichla temensis*. Em outro artigo, os efeitos genotóxicos e neurotóxicos do efluente de estação de tratamento foram avaliados em duas espécies *Pleuronichthys cornutus* e *Conger myriaster*, ambas as espécies indicaram a presença de genotóxicos e neurotóxicos no efluente. Um estudo utilizou duas espécies de gêneros diferentes *Helicolenus dactylopterus* e *Conger conger*, e constatou que os espécimes de *Conger* são bioindicadores mais sensíveis a contaminação por armas químicas (tabela 2).

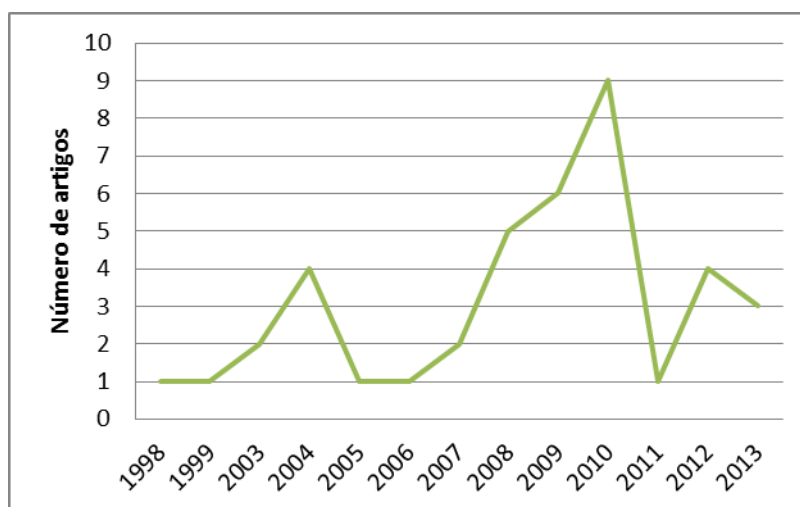


Gráfico 1. Número de artigos sobre biomonitoramento utilizando o ensaio cometa em peixes.

O ensaio cometa foi utilizado por 20% dos artigos para avaliar a genotoxicidade de água poluídas. Foram avaliados os efeitos genotóxicos de efluente de estação de tratamento em três trabalhos. Nos demais artigos, vários compostos genotóxicos foram avaliados (tabela 3).

Deve-se considerar que os efeitos encontrados podem ficar restritos a espécie estudada. Além disso, devido à variedade de efeitos de uma substância tóxica, um teste isolado não é suficiente para avaliar sua ação sobre um organismo

(FRENZILI et al., 2009). Desta forma, alguns programas de biomonitoramento utilizam múltiplos biomarcadores para avaliar a toxicidade. Considerando os artigos selecionados, 27,5% utilizam exclusivamente o ensaio cometa nas análises, muitos trabalhos combinaram o ensaio cometa e o teste do micronúcleo p sceo (gráfico 2).

Tabela 1. G neros mais estudados nos artigos selecionados sobre biomonitoramento utilizando o ensaio cometa em peixes.

G�neros	Autor e ano de publicação
<i>Astyanax</i>	GRISOLIA et al., 2009
	RAMSDORF et al., 2012
<i>Conger</i>	PARK et al., 2009
	DELLA TORRE et al., 2010
<i>Cyprinus</i>	GRISOLIA et al., 2009
	KLOBU��AR et al., 2010
<i>Limanda</i>	AKCHA et al., 2003
	AKCHA et al., 2004
<i>Oreochromis</i>	GONTIJO et al., 2003
	GRISOLIA et al., 2009
	HASHIMOTO et al., 2012
<i>Prochilodus</i>	SIMONIELLO et al., 2009
	POLETTA et al., 2013
<i>Solea</i>	COSTA et al., 2008
	WESSEL et al., 2010

Tabela 2. Diferentes espécies estudadas em um mesmo artigo.

<i>Espécies</i>	<i>Autor e ano de publicação</i>
<i>Steindachnerina insculpta</i>	GRISOLIA et al., 2009
<i>Geophagus brasiliensis</i>	
<i>Cichla temensis</i>	
<i>Hoplias malabaricus</i>	
<i>Astyanax bimaculatus lacustres</i> ,	
<i>Oreochromis niloticus</i>	PARK et al., 2009
<i>Cyprinus carpio</i>	
<i>Pleuronichthys cornutus</i>	
<i>Conger myriaster</i>	
<i>Helicolenus dactylopterus</i>	DELLA TORRE et al., 2010
<i>Conger conger</i>	

Tabela 3 – Genotóxicos que foram avaliados nos artigos selecionados e autor e ano de publicação.

Genotóxicos	Autor e ano de publicação
Aflatoxina B1	HASHIMOTO et al., 2012
Armas químicas de dumping	DELLA TORRE et al., 2010
Benzocaína	GONTIJO et al., 2003
Bifenilos policlorados	AKCHA et al., 2003
Cipermetrina	SIMONIELLO et al., 2009
Cobre	POLETTA et al., 2013
Contaminantes metálicos e orgânicos	MACHADO et al., 2013
Efluente de estação de tratamento	COSTA et al., 2008
	WIRZINGER et al., 2007
	GRISOLIA et al., 2009
	PARK et al., 2009
Estireno	MIGLIORE et al., 2006
Furadan	MOHANTY et al., 2013
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.	AKCHA et al., 2003
	WESSEL et al., 2010
Mercúrio	PEREIRA et al., 2010
Metanossulfonato de metilo	DE ANDRADE et al., 2004
Metil metanossulfonato	DEGUCHI et al., 2008
Microcistina	HASHIMOTO et al., 2012
Mitomicina C	DEGUCHI et al., 2008

Nitrofurantoína	MITCHELMORE et al., 1998
Nitropireno	MITCHELMORE et al., 1998
Nitrosoguanidina	MITCHELMORE et al., 1998
Peróxido de hidrogênio	MITCHELMORE et al., 1998
ph	POLETTA et al., 2013
Poluição ambiental	FRENZILLI et al., 2009
	DE ANDRADE et al., 2004
	JAKŠIĆ et al., 2005
	FRENZILLI et al., 2008
	FASULO et al., 2010
	KLOBUČAR et al., 2010
	ŠRUT et al., 2010
	PENDERS et al., 2012
	RAMSDORF et al., 2012
Uranio	GUIMARÃES et al., 2010

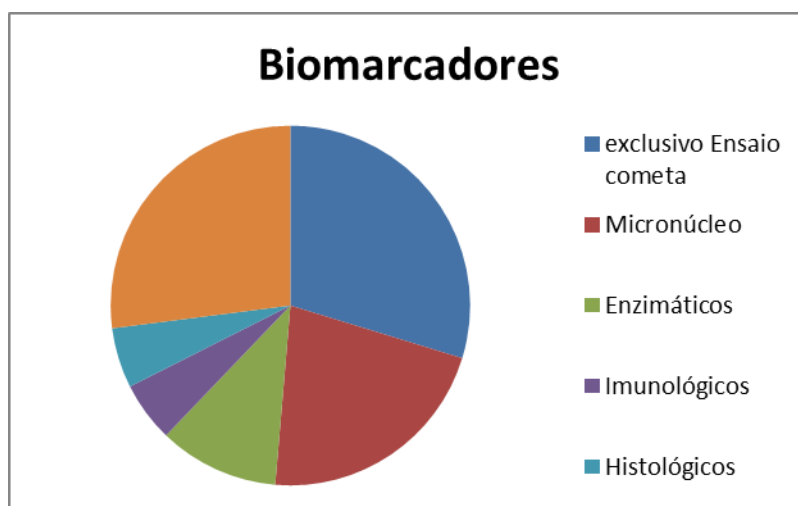


Gráfico 2. Tipos de biomarcadores utilizados nos artigos sobre biomonitoramento utilizando o ensaio cometa em peixes.

O número médio de autores nos trabalhos é de 5,8, e o trabalho com maior quantidade de autores é “*Cytogenetic biomonitoring of inhabitants of a large uranium mineralization area: the municipalities of Monte Alegre, Prainha, and Alenquer, in the State of Para, Brazil*”, com 14 autores.

Em estudos de biomonitoramento utilizando ensaio cometa em peixes, os esforços de pesquisa foram desenvolvidos principalmente por autores brasileiros. Os autores italianos publicaram 10% dos artigos. Houve parceria de diferentes países em 30% dos trabalhos (gráfico 3).



Gráfico 3. Número de artigos sobre biomonitoramento utilizando o ensaio cometa em peixes em relação ao país de filiação dos autores.

O Brasil se destaca no cenário mundial pela grande quantidade de água doce dos seus rios, possui cerca de 53% da produção da água doce da América Latina e 12% do total mundial (DA CUNHA REBOUÇAS et al., 1999). Este pode ser um fator que justifica a quantidade de trabalhos produzidos por autores filiados a instituições brasileiras. A quantidade significativa de parcerias realizadas entre instituições de diferentes países reflete que estes trocam informações, experiências e produzem conhecimento científico.

Diferentes revistas publicaram sobre o assunto, em um total de 29 revistas (tabela 4). A revista com mais alta taxa de publicação foi *"Mutation Research-Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis"*, com 20% das publicações. Um dos critérios de avaliação do contexto do artigo é a revista em que ele foi publicado (VANTI, 2002), além disso, a importância e o reconhecimento do artigo, ou seja, seu impacto, também pode ser medido pelo número de citações (MACIAS-CHAPULA, 1998). Neste sentido, o artigo com maior quantidade de citações foi *"The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments"*, publicado por com 97 citações, seguido de *"Detection of DNA strand breaks in brown trout (Salmo trutta) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay"*, com 77 citações e *"Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (Limanda limanda) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds"*, com 67 citações. Esta é uma tendência

esperada na literatura, onde poucos artigos são muitos citados, enquanto que muitos recebem pouca ou nenhuma citação (NICOLAISEN; HJORLAND, 2007).

Tabela 4 – Revistas com a quantidade de artigos publicados sobre biomonitoramento utilizando o ensaio cometa em peixes.

Revistas	Número de artigos	Autores/ano
AQUATIC TOXICOLOGY	4	MACHADO et al., 2013 ANBUMANI et al., 2012 FRENZILLI et al., 2008 MITCHELMORE et al., 1998
ARCHIVES OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY	1	PEREIRA et al., 2010
ARHIV ZA HIGIJENU RADA I TOKSIKOLOGIJU	1	ŠRUT et al., 2010
BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY	1	HASHIMOTO et al., 2012
BRAZILIAN JOURNAL OF OCEANOGRAPHY	1	AZEVEDO et al., 2012
BULLETIN OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY	1	SIMONIELLO et al., 2009
CELL BIOLOGY AND TOXICOLOGY	1	GUIMARÃES et al., 2010
ECOTOXICOLOGY	1	KLOBUČAR et al., 2010
ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY	1	FASULO et al., 2010
ENVIRONMENTAL AND MOLECULAR MUTAGENESIS	1	KILEMADE et al., 2004
ENVIRONMENTAL MONITORING AND ASSESSMENT	1	RAMSDORF et al., 2012
ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY	1	DEGUCHI et al., 2008
GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY	1	GRISOLIA et al., 2009
JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY	1	CORTÉS-GUTIÉRREZ et al., 2011
MARINE ENVIRONMENTAL RESEARCH	1	WESSEL et al., 2010
MARINE POLLUTION BULLETIN	1	JAKŠIĆ et al., 2005
MOLECULAR & CELLULAR TOXICOLOGY	1	PARK et al., 2009
MOLECULAR CYTOGENETICS	1	HOVHANNISYAN et al., 2010
MUTAGENESIS	2	BATTERSHILL et al., 2008 MIGLIORE et al., 2006
MUTATION RESEARCH-FUNDAMENTAL AND MOLECULAR MECHANISMS OF MUTAGENESIS	2	AKCHA et al., 2004 BIHARI et al., 2004
MUTATION RESEARCH-GENETIC TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL MUTAGENESIS	8	GONTIJO et al., 2003 AKCHA et al., 2003 DE ANDRADE et al., 2004 WIRZINGER et al., 2007 PENDERS et al., 2012

		POLETTA et al., 2008 COSTA et al., 2008 RAMSDORF et al., 2008
MUTATION RESEARCH-REVIEWS IN MUTATION RESEARCH	1	FRENZILLI et al., 2009
NEOPLASMA	1	FRENZILLI et al., 1999
PESTICIDE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY	1	POLETTA et al., 2013
RESEARCH JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY	1	MOHANTY et al., 2013
REVIEWS IN FISHERIES SCIENCE	1	DA ROCHA et al., 2009
SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT	1	DELLA TORRE et al., 2010
TOXICOLOGY LETTERS	1	SHAPOSHNIKOV et al., 2010

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas últimas décadas, o crescimento da industrialização, urbanização e atividades agrícolas, provocaram grandes impactos nos ecossistemas aquáticos. Desta forma, programas de biomonitoramento tornam-se cada vez mais necessários. Como o ensaio cometa é uma importante ferramenta nestes programas, conhecer suas principais aplicações, assim como os organismos mais sensíveis pode ser útil em estudos futuros. Verificamos que o ensaio cometa muitas vezes é utilizado com outras técnicas para aumentar a eficiência da avaliação sobre determinados genotóxicos. As espécies *Steindachnerina insculpta*, *Cichla temensis*, *Pleuronichthys cornutus*, *Conger myriaster* e *Conger conger* foram boas indicadoras da presença de genotóxicos e neurotóxicos nos estudos, porém a *Helicolenus dactylopterus* não foi muito sensível nas análises. A maioria dos estudos avaliou a poluição ambiental, mas vários outros compostos podem ser utilizados em testes de genotoxicidade. Portanto, podemos concluir que em estudos de biomonitoramento a técnica de ensaio cometa é bem eficiente e deve continuar a ser utilizada.

REFERÊNCIAS

- AKCHA, F.; VINCENT HUBERT, F.; PFHOL-LESZKOWICZ, A. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (< i> Limanda limanda</i>) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1, p. 21-32, 2003.
- AKCHA, F.; LEDAY, G.; PFOHL-LESZKOWICZ, A. Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (< i> Limanda limanda</i>) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 552, n. 1, p. 197-207, 2004.
- AL-SABTI, Kabil; METCALFE, Chris D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 343, n. 2, p. 121-135, 1995.
- ANBUMANI, S.; MOHANKUMAR, Mary N. Gamma radiation induced micronuclei and erythrocyte cellular abnormalities in the fish *Catla catla*. **Aquatic Toxicology**, v. 122, p. 125-132, 2012.
- AZEVEDO, Juliana de Souza; BRAGA, Elisabete de Santis; RIBEIRO, Ciro Alberto Oliveira. Nuclear abnormalities in erythrocytes and morphometric indexes in the catfish *Cathorops spixii* (Ariidae) from different sites on the southeastern Brazilian coast. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 60, n. 3, p. 323-330, 2012.
- BATTERSHILL, J. M.; BURNETT, K.; BULL, S. Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in peripheral blood lymphocytes: impact on design of biomonitoring studies. **Mutagenesis**, v. 23, n. 6, p. 423-437, 2008.
- BIHARI, Nevenka; FAFANDEL, Maja. Interspecies differences in DNA single strand breaks caused by benzo (a) pyrene and marine environment. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 552, n. 1, p. 209-217, 2004.
- CESTARI, Marta Margarete et al. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 270-274, 2004.
- COLLINS, Andrew R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.
- COSTA, Pedro M. et al. Genotoxic damage in *Solea senegalensis* exposed to sediments from the Sado Estuary (Portugal): Effects of metallic and organic contaminants. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 654, n. 1, p. 29-37, 2008.
- CORTÉS-GUTIÉRREZ, Elva I. et al. New Application of the Comet Assay Chromosome–Comet Assay. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 59, n. 7, p. 655-660, 2011.

DA CUNHA REBOUÇAS, Aldo; BRAGA JR, Braga Júnior; TUNDISI, José Galizia. **Águas doces no Brasil**. Escrituras Editora, 1999.

DA ROCHA, Carlos Alberto Machado et al. Evaluation of Genotoxic Effects of Xenobiotics in Fishes Using Comet Assay—A Review. **Reviews in Fisheries Science**, v. 17, n. 2, p. 170-173, 2009.

DE ANDRADE, Vanessa Moraes; DE FREITAS, Thales RO; DA SILVA, Juliana. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 560, n. 1, p. 57-67, 2004.

DEGUCHI, Yuya et al. Application of a new bioassay technique using goldfish for assessment of water toxicity. **Environmental toxicology**, v. 23, n. 6, p. 720-727, 2008.

DELLA TORRE, Camilla et al. DNA damage, severe organ lesions and high muscle levels of As and Hg in two benthic fish species from a chemical warfare agent dumping site in the Mediterranean Sea. **Science of the total environment**, v. 408, n. 9, p. 2136-2145, 2010.

FASULO, Salvatore et al. A multibiomarker approach in *Coris julis* living in a natural environment. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, n. 7, p. 1565-1573, 2010.

FERRARO, Marcos Vinícius M. et al. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 103-107, 2004.

FRENZILLI, G. et al. Adaptation of SCGE for monitoring marine ecosystems. **Neoplasma**, v. 46, p. 6-7, 1999.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 80-92, 2009.

FRENZILLI, G. et al. Cellular responses in the cyprinid *Leuciscus cephalus* from a contaminated freshwater ecosystem. **Aquatic toxicology**, v. 89, n. 3, p. 188-196, 2008.

GONTIJO, Álisson M. M. C. et al. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1, p. 165-172, 2003.

GRIMM, Nancy B. et al. Global change and the ecology of cities. **Science**, v. 319, n. 5864, p. 756-760, 2008.

GRISOLIA, Cesar K. et al. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. **Genetics and molecular biology**, v. 32, n. 1, p. 138-143, 2009.

GUIMARÃES, Adriana Costa et al. Cytogenetic biomonitoring of inhabitants of a large uranium mineralization area: the municipalities of Monte Alegre, Prainha, and Alenquer, in the State of Pará, Brazil. **Cell biology and toxicology**, v. 26, n. 5, p. 403-419, 2010.

HASHIMOTO, Elisabete Hiromi et al. Biomonitoring of microcystin and aflatoxin co-occurrence in aquaculture using immunohistochemistry and genotoxicity assays. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 151-159, 2012.

HOVHANNISYAN, Galina G. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. **Molecular cytogenetics**, v. 3, n. 1, p. 17, 2010.

JAKŠIĆ, Željko et al. Adriatic coast as a microcosm for global genotoxic marine contamination—A long-term field study. **Marine pollution bulletin**, v. 50, n. 11, p. 1314-1327, 2005.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207–221, 2008.

KILEMADE, M. F. et al. Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as measured by the Comet assay. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 44, n. 1, p. 56-64, 2004.

KLOBUČAR, Göran IV et al. Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology**, v. 19, n. 1, p. 77-84, 2010.

LEE, Richard F.; STEINERT, Scott. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 544, n. 1, p. 43-64, 2003.

MACIAS-CHAPULA, C. A. O papel da informetria e da cienciometria e sua perspectiva nacional e internacional. **Ciência da informação**, v. 27, n. 2, p. 134-140, 1998.

MACHADO, Anderson Abel de Souza et al. Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. **Aquatic Toxicology**, v. 138, p. 60-69, 2013.

MATTHEWS, Robin A. et al. Biological monitoring: Part IIA—receiving system functional methods, relationships and indices. **Water Research**, v. 16, n. 2, p. 129-139, 1982.

MCGREGOR, D. **Carcinogenicity and genotoxic carcinogens**. In: Ballantyne, B.; MARS, T.; SYVERSEN, T. General and Applied Toxicology. 2 ed. Londres, Macmillan Reference, 2000. p. 1099-1117.

MIGLIORE, L. et al. Relationship between genotoxicity biomarkers in somatic and germ cells: findings from a biomonitoring study. **Mutagenesis**, v. 21, n. 2, p. 149-152, 2006.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. **Aquatic toxicology**, v. 41, n. 1, p. 161-182, 1998.

MOHANTY, G. et al. Use of comet assay in the study of DNA break in blood and gill cells of rohu (*Labeo rohita*) after an exposure to furadan, a carbamate pesticide. **Research Journal of Biotechnology Vol**, v. 8, p. 2, 2013.

MORENO, Pablo; CALLISTO, Marcos. Bioindicadores de qualidade de água ao longo da bacia do Rio das Velhas (MG). **Bioindicadores de qualidade de água. 5a ed. Brasília: Embrapa**, p. 95-116, 2005.

NICOLAISEN, J.; HJORLAND, B. Practical potentials of Bradford's law: A critical examination of the received view. **Journal of Documentation**, v. 63, n. 3, p. 359-377, 2007.

OLIVE, Peggy L.; BANÁTH, Judit P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature protocols**, v. 1, n. 1, p. 23-29, 2006.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

PADRANGI, Raj et al. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 26, n. 4, p. 345-356, 1995.

PARK, So Yun et al. Genotoxic and neurotoxic potential in marine fishes exposed to sewage effluent from a wastewater treatment plant. **Mol. Cell. Toxicol**, v. 5, n. 3, p. 265-271, 2009.

PENDERS, E. J. M. et al. Genotoxic effects in the Eastern mudminnow (*Umbra pygmaea*) after prolonged exposure to River Rhine water, as assessed by use of the in vivo SCE and Comet assays. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 53, n. 4, p. 304-310, 2012.

PEREIRA, Carla Sofia Alves et al. Evaluation of DNA damage induced by environmental exposure to mercury in *Liza aurata* using the comet assay. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 58, n. 1, p. 112-122, 2010.

POLLACK, Noam et al. Environmental persistence of chemicals and their carcinogenic risks to human. **Mutation Research**, v. 528, p.81–91, 2003.

POLETTA, G. L. et al. Caiman latirostris (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleus and comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 2, p. 202-209, 2008.

POLETTA, G. L. et al. Comet assay in gill cells of *Prochilodus lineatus* exposed in vivo to cypermethrin. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 107, n. 3, p. 385-390, 2013.

RAMSDORF, Wanessa Algarte et al. Handling of *Astyanax* sp. for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. **Environmental monitoring and assessment**, v. 184, n. 10, p. 5841-5849, 2012.

RAMSDORF, Wanessa A. et al. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 673, n. 1, p. 78-81, 2009.

SHAPOSHNIKOV, Sergey et al. Twelve-gel slide format optimised for comet assay and fluorescent in situ hybridisation. **Toxicology letters**, v. 195, n. 1, p. 31-34, 2010.

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento ambiental. **Genética Toxicológica. Alcance, Porto Alegre**, p. 167-178, 2003.

SIMONIELLO, M. F. et al. Alkaline comet assay for genotoxic effect detection in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 83, n. 2, p. 155-158, 2009.

SINGH, Narendra P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SPEIT, Günter; HARTMANN, Andreas. The comet assay (single-cell gel test). In: **DNA repair protocols**. Humana Press, 1999. p. 203-212.

SPINAK, Ernesto. Indicadores cienciométricos. **Ciência da Informação**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 141-148, 1998.

ŠRUT, Maja et al. Cage exposure of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) for in situ assessment of pollution-related genotoxicity. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 61, n. 1, p. 29-36, 2010.

VANTI, N. A. P. Da bibliometria à webometria: uma exploração conceitual dos mecanismos utilizados para medir o registro da informação e a difusão do conhecimento. **Ciência da Informação**, v. 31, n. 2, p. 152-162, 2002.

WESSEL, Nathalie et al. Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). **Marine environmental research**, v. 69, p. S71-S73, 2010.

WIRZINGER, Gertraud et al. Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): A suitable biomonitoring tool?. **Mutation**

Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 628, n. 1, p. 19-30, 2007.